

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 12 日現在

機関番号：32660

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K14131

研究課題名(和文)セラミックスナノ粒子を用いたOTN-NIRナノ温度イメージング

研究課題名(英文)OTN-NIR fluorescence nanothermal imaging by using ceramic nanoparticles

研究代表者

曽我 公平 (SOGA, Kohei)

東京理科大学・基礎工学部・教授

研究者番号：50272399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：従来と比べ10倍深い、数cmの深度の観察が可能なOTN-NIR蛍光を用いて、退色しない、光毒性のない、自家蛍光の影響を受けない、生体深部のナノ温度イメージングを顕微鏡視野で実現することを目標に、セラミックスナノ粒子を用いたOTN-NIR蛍光バイオイメージングでナノ温度計測を目的として研究を行った。その結果 NaYF₄:Ho/Ybナノ粒子にリガンド置換によりPEGを導入し、親水化単分散することに成功した。また、これを用いて温度特性を評価したところ、水中と疎水溶媒系の蛍光強度比では異なる温度特性を示すことを明らかにした。さらに、OTN-NIR蛍光顕微鏡に温度制御ステージを導入した。

研究成果の概要(英文)：OTN-NIR fluorescence bioimaging can achieve several cm observation depth, which is ten times deeper than the current imaging with shorter wavelength. By developing the OTN-NIR fluorescence nanothermometry probe, we can achieve nanothermometry without suffered by non-color-fading, non-phototoxic and much deeper fluorescence bioimaging. As a result of project, by ligand exchange onto oleic acid modified beta NaYF₄ nanoparticle, monodispersed hydrophilic OTN-NIR fluorescence nanothermometry probe was synthesized. Also, temperature-controlled stage was installed onto the OTN-NIR fluorescence bioimaging microscope for the OTN-NIR fluorescence nanothermal imaging.

研究分野：無機材料(物性)

キーワード：ナノ温度イメージング OTN近赤外 バイオイメージング 蛍光 希土類 セラミックス ナノ粒子

1. 研究開始当初の背景

物体の存在を影や吸収で認識しようとする場合、そのイメージングにおける分解能は用いる光の波長の影響を受け、一般に波長よりも分解能を上げることは難しい。天空の星を影や吸収でイメージングすることは、星との距離、星の大きさ、分解能から到底不可能である。しかし、光を発している星は観察することができる。2014年ノーベル化学賞を受賞した超解像顕微鏡も根本的にはこの原理に基づいており、イメージングにとっての蛍光の重要な意味合いの一つである。したがって 100 nm 以下のナノ粒子の存在は、可視光～近赤外光でイメージングを行う光学顕微鏡下で正確に位置を特定し確認することができる。さらに発光を多色化したり時間分散を持たせることにより、**ナノ粒子の発光を用いると光学顕微鏡においても波長よりはるかに高い分解能で対象を観察できる**。蛍光現象は温度の影響を強く受け、なかでも蛍光スペクトルにける複数のバンドの強度比が、準位間のフェルミ分布によって温度に対して系統的に変化する現象は古くから知られており、特に 2010 年以来、希土類含有セラミックスナノ粒子 (rare-earth doped ceramic nanoparticles: RED-CNPs) のアップコンバージョン蛍光スペクトルにおけるスペクトル強度比と、室温付近の温度の相関をとることによるナノ温度計の提案が多く見られるようになってきた[F. Votrone et al., *ACS Nano*, 4, (2010) 3254 など]。一方、申請者らは 1000 nm を超える (over-1000-nm: OTN) 近赤外 (NIR) 波長域では生体の光損失が当時用いられ始めていた 900 nm を中心とするいわゆる「生体の窓」における蛍光バイオイメージングよりも 10 倍程度深い観察深度が得られるという理論的予測に基づき、2005 年以来 OTN-NIR **蛍光バイオイメージングのための蛍光プローブとイメージングシステムの開発**

に、**世界に先駆けて取り組んできた**。これまで数 mm の皮下が限界であった小動物蛍光バイオイメージングにおいて数 cm の、マウスであれば全身におよぶ観察深度が得られることを実証し、また、この技術の普及に向けて島津製作所と共同で開発した OTN-NIR 蛍光小動物イメージングシステムは 2014 年市場投入に向けて動いている。近年になって second biological window としてにわかにな注目を浴びようになってきたこの波長域で、蛍光プローブ開発の材料工学から顕微イメージングシステム、小動物イメージングシステムの開発にわたるまで実証ベースの実績をあげてきた[K. Soga et al., *Proc. SPIE*, 7598 (2010) 759807-1]。アップコンバージョン発光を用いたナノ温度計測の報文はここ数年見られるが、OTN-NIR 波長域でのナノ温度計の提案はこれまでになく、さらにこれをバイオイメージングに接続した例は報告されていない。そこで本研究では独自に開発してきた OTN-NIR 蛍光顕微バイオイメージングシステムに、スペクトル解析を行いつつ画面内をスキャンするシステムを導入し、OTN-NIR 蛍光によるナノ温度バイオイメージングの実現を狙う。これまでサーモグラフ等高い分解能が得られないイメージング技術に依存してきたバイオサーマルイメージングの世界で、**生体におけるナノ温度分布は全く未知の領域**であり、生命現象における機序を解き明かす新たな切り口として一石を投じることにより、**生命科学の進歩に寄与する新たなツールを提供する**。また、本研究によって得られる成果はバイオイメージングのみならず、ナノ材料創成、ナノマシンなどの**先進テクノロジーにおけるナノ温度計測の可能性を拓く**。

2. 研究の目的

従来と比べ 10 倍深い、数 cm の深度の観察が可能な**希土類含有セラミックスナノ粒子**

の OTN-NIR 蛍光を用いて、**退色しない、光毒性のない、自家蛍光の影響を受けない、生体深部のナノ温度イメージング**を顕微鏡視野で実現する。ナノ粒子の蛍光スペクトルの強度比を用いた温度計測では、温度を測定する範囲がナノ領域に限定されるので、超解像顕微鏡と同様の原理に基づき、蛍光波長よりもはるかに小さい領域の温度測定が可能であり、ここ数年、急速に測定原理提案が行われている。希土類イオンの発光スペクトル比の温度変化を用いたものとしてはアップコンバージョンにより近赤外励起可視発光でナノ温度測定の提案がされているが、本研究では代表者らが独自に開発してきた**セラミックスナノ粒子を用いた OTN-NIR 蛍光バイオイメージングでナノ温度計測**を実現する。

3. 研究の方法

温度計測を行うための蛍光プローブはすでにプロトタイプを作製済みである。図に示すように Ho と Yb を共ドープした NaYF_4 ($\text{NaYF}_4:\text{Ho}/\text{Yb}$) は、980 nm の励起光により Yb による 1070 nm 付近の蛍光と Ho による 1180 nm 付近の蛍光を示す。励起光の吸収は Yb が担い、Yb から Ho へのフォノンアシストエネルギー移動により Ho の発光が現れる他、途中に経る多フォノン緩和が影響するため、Yb と Ho の蛍光強度比は室温付近で温度依存性を示す。原理的に直線ではないものの、高い相関を示すことからこの蛍光スペクトルの測定により 0.5 程度の精度で動物の体温に近い温度域での温度の推定が可能であることはすでに予備実験により実証している [T. Matsumoto, K. Soga et al., PT-BMES 2014, Sept. 12-15, 2014, Hsinchu, Taiwan.]。

$\text{NaYF}_4:\text{Ho}/\text{Yb}$ ナノ粒子は、キャッピング剤としてオレイン酸を添加した水熱合成法により合成する。この方法によると 10 ~

100 nm 程度に粒径を制御した単分散ナノ粒子の合成が可能であり、さらにリガンド置換により親水性高分子を表面に導入すると、イオン性の高い生体環境に相当する水溶液において高い単分散性を維持できることが知られている。 $\text{NaYF}_4:\text{Ho}/\text{Yb}$ ナノ粒子には結晶相と結晶相が存在し、そのフォノンエネルギーが異なる。相と相の作り分けは、すい熱合成における出発溶液組成、温度、添加元素によって可能である。ナノ粒子の粒径については一般に半径の三乗に比例して一粒子あたりの蛍光強度を増すが、粒径が大きくなるほど温度に対する応答性は低下する。本研究では OTN-NIR 蛍光で、室温 ~ 体温付近の温度を推定する上で好都合な結晶相について検討を行うとともに、希土類イオンの濃度や最適粒径のコントロールにより OTN-NIR 蛍光ナノ温度プローブとしての材料の最適化を行う。

一方装置としては、現有の OTN-NIR 顕微バイオイメージングシステムに対して、温度調節位置制御ステージを設置し、Ho 蛍光イメージング像と Yb 蛍光イメージング像の撮像の検証を行う。

4. 研究成果

β $\text{NaYF}_4:\text{Ho}/\text{Yb}$ ナノ粒子にリガンド置換により PEG を導入し、親水化単分散することに成功した。また、これを用いて温度特性を評価したところ、水中と疎水溶媒系の蛍光強度比では異なる温度特性を示すことを明らかにした。さらに、OTN-NIR 蛍光顕微鏡に温度制御ステージを導入した。

シクロヘキサン中における OA- NaYF_4 ナノ粒子、および蒸留水中における PEG- NaYF_4 ナノ粒子の Ho^{3+} (1200 nm) と、 Er^{3+} (1550 nm) の蛍光強度比の温度依存性を図 1 に示す。図 1 より、シクロヘキサン中における蛍光強度比は温度上昇とともに増加することがわかった。これは Yb^{3+} から

Ho³⁺へのエネルギー移動は温度依存性を示すフォノン介助エネルギー移動が支配的であるのに対し、Yb³⁺からEr³⁺へのエネルギー移動は温度依存性を示さない共鳴エネルギー移動が支配的であることが原因と考えられる。一方蒸留水中における蛍光強度比は温度上昇とともに減少することがわかった。これは水中では分散媒中の極性分子による振動緩和により、励起準位から熱失活するため、Ho³⁺の蛍光強度は変化せず、Er³⁺の蛍光強度が増加したことが原因と考えられる。以上より OA-NaYF₄ ナノ粒子、PEG-NaYF₄ ナノ粒子のそれぞれ疎水性溶媒および水中におけるHo³⁺とEr³⁺の蛍光強度比は温度に対して一律に変化することがわかった。そのため NaYF₄:Yb³⁺/Er³⁺/Ho³⁺ ナノ粒子の波長 1000 nm 以上の近赤外光を利用した温度測定が可能であると期待される。

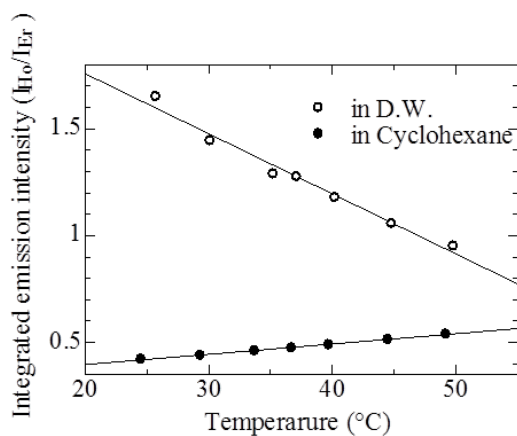


図1 各溶媒におけるNaYF₄:Yb³⁺/Er³⁺/Ho³⁺の蛍光強度比の温度依存性

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 14 件)

1) [Invited] 上村 真生、曾我 公平, "近赤外蛍光ナノ粒子を利用するナノ温度イメージング," 日本化学会 第96春季年会 (同志社大学 京田辺キャンパス, 2016年3月24日~3月27日).

2) [Invited] Kohei SOGA, Masao KAMIMURA, "Probe Design and Processing for Biophotonics in the Second Biological Window," The 5th International Solvothermal and Hydrothermal Association Conference (ISHA 2016) (NCKU, Tainan, Taiwan, R. O. C., 2016年1月17日~1月20日).

3) [Invited] 曾我公平、竹内司、横田秀夫、岸本英博, "SBW イメージングの現状と課題," 第24回日本バイオイメージング学会 学術集会 (東京理科大学葛飾キャンパス, 2015年9月26日~9月28日).

4) [Invited] Masao Kamimura, Kohei Soga, "Surface Modified Rare-earth Doped Ceramic Nanophosphors for Fluorescence Bioimaging and Nanothermometry in the Second Biological Window," 2015 International Symposium on Chemical and Polyscale Technologies for Biomedical Application and Environmental Sustainability (ISCPT) (Chientan Youth Activity Center, Taipei, Taiwan, 2015年9月6日~9月9日).

5) [Oral] Kohei SOGA, Masao KAMIMURA, "Ceramic Near Infrared Phosphors for Nanothermometry in the Second Biological Window," 40th International Conference and Exposition on Advanced Ceramics and Composites (Hilton Daytona Beach Resort and

Ocean Center, Daytona Beach, Florida, USA, 2016年1月24日~1月29日).

6) [Oral] Eva Hemmer, Masao Kamimura, Francois Logar, Kohei Soga, Fiorenzo Vetrone, "Lanthanide-doped nanostructures for near-infrared nanothermometry," The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2015) (Hawaii Convention Center, Honolulu, Hawaii, 2015年12月15日~12月20日).

7) [Oral] Masao Kamimura, Taiki Matsumoto, Satoru Suyari, Kohei Soga, "Nanothermometry in the second biological window based on temperature dependent near-infrared fluorescence of rare-earth doped ceramic nanophosphors," The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2015) (Hawaii Convention Center, Honolulu, Hawaii, 2015年12月15日~12月20日).

8) [Oral] 上村 真生, 松本 泰来, 須鎗 聡, 曽我 公平, "第2の生体の窓を利用する近赤外蛍光ナノ温度イメージング," 第37回日本バイオマテリアル学会大会 (京都テルサ, 2015年11月9日~11月10日).

9) [Oral] 上村 真生, 松本 泰来, 須鎗 聡, 曽我 公平, "PEG化セラミックスナノ粒子を用いた近赤外蛍光ナノ温度計," 第64回高分子討論会 (東北大学川内キャンパス, 2015年9月15日~9月17日).

10) [Oral] 上村 真生, 松本 泰来, 須鎗 聡, 曽我 公平, "希土類含有セラミックスナノ粒子の近赤外発光を用いたナノ温度イメージング," 日本分析化学会第64年会 (九州大学伊都キャンパス, 2015年9月8日~9月11日).

10) [Oral] Masao Kamimura, Satoru Suyari, Taiki Matsumoto, Kohei Soga, "Surface modification on rare-earth doped ceramic nanophosphors via ligand exchange method for

near-infrared biophotonics," The 32nd International Conference of Photopolymer Science and Technology (Makuhari Messe, Chiba, 2015年6月24日~6月26日).

11) [Poster] 須鎗 聡, 松本 泰来, 上村 真生, 曽我 公平, "希土類含有セラミックスナノ粒子の近赤外蛍光強度比によるナノ温度イメージング," 第24回日本バイオイメージング学会学術集会 (東京理科大学葛飾キャンパス, 2015年9月26日~9月28日).

12) [Poster] Satoru Suyari, Taiki Matsumoto, Masao Kamimura, Kohei Soga, "Facile PEGylation on Rare-Earth Doped Ceramic Nanophosphors via Ligand Exchange Method for Near-Infrared Bioimaging," 2015 International Symposium on Chemical and Polyscale Technologies for Biomedical Application and Environmental Sustainability (ISCPT) (Chientan Youth Activity Center, Taipei, Taiwan, 2015年9月6日~9月9日).

13) [Poster] Masao Kamimura, Taiki Matsumoto, Kohei Soga, "Novel nanothermal sensing based on over-1000 nm near-infrared emission of rare-earth doped ceramic nanophosphors," 8th International Conference on Materials for Advanced Technologies of the Materials Research Society of Singapore & 16th IUMRS-International Conference in Asia (ICMAT2015&IUMRS-ICA2015) (Suntec Singapore, Singapore, 2015年6月28日~7月3日).

14) [Poster] 上村 真生, 松本 泰来, 須鎗 聡, 曽我 公平, "リガンド交換法によるPEG化希土類含有セラミックスナノ粒子の作製と近赤外バイオフォトニクスへの応用," 第64回高分子学会年次大会 (札幌コンベンションセンター, 2015年5月27日~5月29日).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

曾我 公平 (SOGA, Kohei)

東京理科大学・基礎工学部・教授

研究者番号：50272399

(2) 研究分担者

上村 真生 (KAMIMURA, Masao)

東京理科大学・基礎工学部・助教

研究者番号：80706888

岸本 英博 (KISHIMOTO, Hidehiro)

琉球大学大学院・医学研究科・教授

研究者番号：80251213

横田 秀夫 (YOKOTA, Hideo)

独立行政法人理化学研究所・チームリーダー

研究者番号：00261206

(3) 連携研究者

()

研究者番号：